

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR DE GLIOMAS

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO CAROTENOIDE FUcoxantina NA LAMININA
EM CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME HUMANO**

João Victor Krüger Pinto

Florianópolis

2018

João Victor Krüger Pinto

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO CAROTENOIDE FUcoxantina NA LAMININA
EM CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME HUMANO**

Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas do
Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de
Santa Catarina submetido como requisito para obtenção do
Grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Cláudia Beatriz Nedel Mendes de
Aguiar

Coorientadora: MSc. Naiani Ferreira Marques

Florianópolis

2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Pinto, João Victor Krüger

Avaliação dos efeitos do carotenoide fucoxantina na laminina em células de glioblastoma multiforme humano / João Victor Krüger Pinto; orientadora, Cláudia Beatriz Nedel Mendes de Aguiar, coorientadora, Naiani Ferreira Marques, 2018.

57 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) –
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas,
Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Glioblastoma multiforme. 3. Fucoxantina. 4. Laminina. 5. Migração celular. I. Nedel Mendes de Aguiar, Cláudia Beatriz. II. Ferreira Marques, Naiani. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

João Victor Krüger Pinto

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO CAROTENOIDE FUcoxantina NA LAMININA
EM CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME HUMANO**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Bacharel em Ciências Biológicas e aprovado em sua forma final pelo Centro de Ciências Biológicas.

Florianópolis, 27 de novembro de 2018.

Prof. Dr. Carlos Roberto Zanetti
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Cláudia Beatriz Nedel Mendes de Aguiar
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dr.^a Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro
Examinadora Titular
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Ricardo Castilho Garcez
Examinador Titular
Universidade Federal de Santa Catarina

Dr.^a Karen Andrinéia de Oliveira
Examinador Suplente
Secretaria de Estado da Saúde / SC

Este trabalho é dedicado à toda minha família pelo apoio e criação que me proporcionaram até chegar aqui.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Universidade Federal de Santa Catarina e ao Centro de Ciências Biológicas por possibilitar a existência deste trabalho.

Agradeço também ao CNPq pelo financiamento através de bolsa auxílio.

À banca por disponibilizar seu tempo para avaliar e dar sua contribuição.

À prof.^a Dr.^a Cláudia Beatriz Nedel Mendes de Aguiar, minha orientadora, que me aceitou no laboratório e acreditou no meu potencial.

À minha coorientadora, Naiani Marques, que me ajudou muito na realização desse trabalho, dedicando muito do seu tempo em me acompanhar e auxiliar nos experimentos e no seu entendimento.

À prof.^a Dr.^a Carla Inês Tasca por disponibilizar o espaço do Laboratório de Neuroquímica 4 para a realização dos experimentos e por toda ajuda prestada a mim.

Aos meus colegas dos dois laboratórios, Anderson, Beatriz, Caio, Daniel, Flávia, Gabriela, Karen, Luan, Luisa, Naiani, Tetsade e Victor, por todo apoio, ajuda e ensinamentos que me proporcionaram, assim como por fazerem meus dias no laboratório mais divertidos.

Às alunas do Laboratório Neuroquímica 3, Ana Paula, Ingrid e Isabella, por sempre se disponibilizarem em me auxiliar e em tirar minhas dúvidas sempre que possível.

Também gostaria de agradecer aos meus pais, Francielle e César, e à minha irmã, Maria Eduarda, pelo apoio, incentivo e carinho em todos os momentos da minha graduação, principalmente na época de TCC.

A todo o resto da minha família, que me educou e me fez ser quem eu sou hoje, cada um contribuindo um pouco para meu crescimento e amadurecimento. Sem todos vocês, eu não estaria aqui hoje.

À minha namorada, Kathleen, minha melhor amiga e minha companheira, por todos esses 7 anos juntos, me fazendo feliz e me apoiando em todos os momentos, me dando um amor incondicional, tornando todos os desafios mais fáceis e me fazendo uma pessoa melhor.

Aos meus amigos da RAÇA e àqueles que agregaram, David, Gustavo, Leo, Losso, Rafa, Vini, Bea, Helo e Flávia, por me acompanharem até aqui por livre e espontânea vontade, compartilhando ótimos momentos e me possibilitando uma fuga da rotina, estando sempre ao meu lado ao longo de muitos anos.

Aos amigos que fiz na graduação, da turma 14.1, especialmente Duda, Matheus, Bruno Tavares, Andressa, Bruno Dominski, Artur, Bryan e João, que sempre alegraram até as aulas mais chatas ao longo desses 5 anos.

Amo todos vocês, obrigado por tudo ♥

*“If you wanna make the world a better place
take a look at yourself and then make a change”
(Michael Jackson, 1988)*

RESUMO

Câncer é um grupo de doenças caracterizado pelo crescimento de uma massa de células que perderam o controle sobre o seu crescimento e sua proliferação. Em termos mundiais, o câncer é a segunda maior causa de morte, ficando atrás apenas de doenças cardiovasculares. Os gliomas são neoplasias originadas das células da glia e correspondem a mais de 80% dos tumores malignos do Sistema Nervoso Central. O glioblastoma multiforme é o tipo mais agressivo e mais comum de glioma, tendo os piores prognósticos, com uma sobrevida de aproximadamente 14 meses. Sua terapia padrão é através de ressecção cirúrgica seguida de radioterapia e quimioterapia. O quimioterápico mais utilizado é a temozolomida, o qual para o ciclo celular levando as células à apoptose. Apesar dos avanços nos tratamentos, a sobrevida dos pacientes continua curta. Um dos motivos para a alta taxa de mortalidade é a capacidade de migração celular do glioblastoma, o que o leva a invadir os tecidos adjacentes. Esse mecanismo torna difícil a ressecção total do tumor e aumenta as chances de recorrência. Essas características estão associadas com a adesão celular, a qual acontece pela adesão da célula em moléculas presentes na matriz extracelular (MEC). A laminina (LN) é uma das principais moléculas da MEC e está muito associada com a adesão celular. No entanto, a LN também ativa cascatas intracelulares que estão relacionadas com a migração. A fucoxantina (Fx) já demonstrou efeitos anticâncer, inclusive antimigratórios, se mostrando uma substância interessante para um futuro uso clínico. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da fucoxantina em componentes da matriz extracelular de células GBM1 de glioblastoma multiforme humano. Em primeiro lugar, constatou-se que a fucoxantina diminuiu significativamente a viabilidade em células GBM1 na concentração de 100 μ M. A adesão celular das células GBM1 na matriz extracelular de células tratadas com fucoxantina também diminuiu após 24 h. Por fim, observou-se que a produção de LN também diminuiu após o tratamento com Fx. Esses resultados sugerem que a matriz extracelular está relacionada com a migração celular em glioblastoma multiforme e que pode se tornar um alvo de futuras pesquisas.

Palavras-chave: Glioma. Laminina. Adesão celular. Migração celular. Câncer. Metástase.

ABSTRACT

Cancer is a group of diseases characterized by the growth of a mass of cells that have lost control over their growth and their proliferation. Globally, cancer is the second leading cause of death, behind only cardiovascular disease. Gliomas are neoplasms originating from glial cells and correspond to more than 80% of malignant Central Nervous System tumors. Glioblastoma multiforme is the most aggressive and most common type of glioma, with the worst prognosis, with a survival of approximately 14 months. Its standard therapy is surgical resection followed by radiation therapy and chemotherapy. The most commonly used chemotherapeutic agent is temozolomide, which stops the cell cycle leading to apoptosis. Despite advances in treatments, patient survival remains short. One of the reasons for the high mortality rate is the cellular migration capacity of glioblastoma, which leads it to invade adjacent tissues. This mechanism makes it difficult to completely resect the tumor and increases the chances of recurrence. These characteristics are associated with cell adhesion, which occurs by cell adhesion in molecules present in the extracellular matrix (ECM). Laminin (LN) is one of the major molecules of ECM and is very associated with cell adhesion. However, LN also activates intracellular cascades that are related to migration. Fucoxanthin (Fx) has already shown anticancer effects, including antimigratory, if it proves to be an interesting substance for future clinical use. The objective of this work was to evaluate the effects of fucoxanthin on extracellular matrix components of GBM1 cells of human glioblastoma multiforme. Firstly, fucoxanthin was found to significantly decrease the viability in GBM1 cells at the concentration of 100 μ M. Cellular adhesion of GBM1 cells in the extracellular matrix of fucoxanthin treated cells also decreased after 24 h. Finally, it was observed that LN production also decreased after treatment with Fx. These results suggest that the extracellular matrix is related to cell migration in glioblastoma multiforme and may become a target of future research.

Keywords: Glioma. Laminin. Cell adhesion. Cell migration. Cancer. Metastasis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Transformação da fucoxantina em fucoxantíol em mamíferos.....	27
Figura 2 - Estrutura esquemática da laminina e seu posicionamento na membrana basal.	30
Figura 3 – Diminuição da matriz extracelular em células tratadas com fucoxantina.....	31
Figura 4 - Fucoxantina reduz a viabilidade celular de células GBM1.	36
Figura 5 - Fucoxantina não altera a adesão das células GBM1 depois de 6 h.	37
Figura 6 - Fucoxantina não altera a adesão das células GBM1 depois de 12 h.	37
Figura 8 – Fucoxantina reduz a adesão de células GBM1 depois de 24 h.....	39
Figura 9 – Fucoxantina reduz a marcação de laminina.....	40

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação dos subtipos de gliomas.....24

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHE – barreira hematoencefálica

CBTRUS – do inglês *Central Brain Tumor Registry of the United States* (Centro de Registro de Tumores no Cérebro dos Estados Unidos)

CEPSH – Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

CSC – do inglês *cancer stem cells* (células-tronco tumorais)

CTC – do inglês *circulating tumor cells* (células tumorais circulantes)

DMEM-F12 – do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12* (meio de cultura para cultura de células)

EGFR – do inglês *epidermal growth factor receptor* (receptor do fator de crescimento epidérmico)

FN - fibronectina

Fx – fucoxantina

FxOH - fucoxantíol

GBM – glioblastoma multiforme

GBM1 – cultura primária de glioblastoma multiforme

IDH1 – do inglês *isocitrate dehydrogenase 1* (isocitrato desidrogenase 1 - proteína)

IDH1 – do inglês *isocitrate dehydrogenase 1* (isocitrato desidrogenase 1 – gene que codifica a proteína isocitrato desidrogenase 1)

IMC – Índice de massa corporal

INCA – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva

LN - laminina

MEC – matriz extracelular

NKCC1 – do inglês *Na-K-Cl cotransporter 1* (cotransportador de Na-K-Cl)

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS – do inglês *phosphate buffered saline* (tampão fosfato-salino)

PBST – do inglês *phosphate buffered saline with Tween 20* (tampão fosfato-salino com Tween 20)

PTEN – do inglês *phosphatase and tensin homolog* (fosfatase homóloga à tensina - gene que codifica a proteína PTEN)

SBF – soro bovino fetal

SNC – Sistema Nervoso Central

TMZ – temozolomida

TP53 – do inglês *tumor protein 53* (gene que codifica a proteína p53)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	22
1.1	CÂNCER E SISTEMA NERVOSO CENTRAL.....	22
1.2	GLIOMAS	24
1.3	GLIOBLASTOMA MULTIFORME.....	25
1.4	FUCOXANTINA.....	26
1.5	MIGRAÇÃO E ADESÃO CELULAR DE GBM.....	28
1.6	MATRIZ EXTRACELULAR EM GBM.....	29
1.7	OBJETIVOS	31
1.7.1	Objetivo geral.....	31
1.7.2	Objetivos específicos	32
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
2.1	CULTURA CELULAR	33
2.2	FUCOXANTINA.....	33
2.3	VIABILIDADE CELULAR	34
2.4	ADESÃO CELULAR	34
2.5	IMUNOCITOQUÍMICA	35
2.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
3	RESULTADOS.....	36
3.1	ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR.....	36
3.2	DETERMINAÇÃO DA ADESÃO CELULAR	36
3.3	AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DE LAMININA.....	39
4	DISCUSSÃO.....	41
5	CONCLUSÕES	43
6	PERSPECTIVAS	44
	REFERÊNCIAS	45
	ANEXOS.....	56

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER E SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Câncer é um conjunto de doenças que tem em comum uma massa tumoral cujas células perderam o controle sobre o seu crescimento e sua proliferação (MUKHERJEE, 2012). Os tumores podem ter origem de uma única célula que se desviou da normalidade, esses são chamados de tumores monoclonais e correspondem à grande maioria. Outros, são chamados de policlonais, quando mais de uma célula do tecido dá origem ao tumor. Nesse caso, cada célula progenitora sofre alterações e origina populações diferentes que, juntas, formam a massa tumoral (WEINBERG, 2008). Muitos especialistas restringem a palavra “câncer” aos tumores malignos, ou seja, aqueles que têm a capacidade de invadir tecidos saudáveis e causar metástase (WEINBERG, 2008). As causas do câncer podem ser muito diversas, como o acúmulo de alterações genéticas (em proto-oncogenes, genes supressores de tumor e genes *caretaker*), mutações espontâneas, exposição a agentes carcinogênicos (como substâncias químicas e radiação), hormônios, vírus ou mesmo um conjunto desses fatores são reconhecidos como de risco para desenvolvimento de câncer (LODISH et al., 2014).

Por volta de um terço dos óbitos por câncer estão relacionados ao alto índice de massa corporal (IMC), baixa ingestão de frutas e vegetais, falta de atividade física, consumo de álcool e/ou uso de tabaco, sendo este último a causa de 22% dos óbitos (GAKIDOU et al., 2017; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018a). Os homens, de modo geral, são mais atingidos por essa doença do que as mulheres (512,9 a cada 100.000 habitantes e 420,6 a cada 100.000, respectivamente) (JEMAL et al., 2017).

O câncer é classificado como doença não transmissível, juntamente com doenças cardiovasculares, neurológicas, diabetes, entre outras. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2015, o câncer foi uma das quatro maiores causas de morte em 113 de 172 países (BRAY et al., 2018). Cerca de 70% das mortes acontecem em países de baixa e média renda (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018a). Esse grupo de doenças é a maior causa de morte de pessoas no mundo, com estimativa de 40.545.000 (71,3%) óbitos no ano de 2016. As neoplasias malignas foram a causa do óbito de 8.966.000 pessoas, representando 22,1% das mortes do grupo e 15,8% do total, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares (31,4% do total) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018b). A estimativa para 2018 é ainda maior, com 18.078.957 novos casos e 9.555.027 mortes (BRAY et al., 2018).

No Brasil, para os anos de 2018-2019, estima-se um número aproximado de 640 mil novos casos de câncer, com uma leve prevalência dos homens sobre as mulheres (324.580 e 310.300 casos, respectivamente). Cerca de 70% dos casos ocorrem nas regiões Sul e Sudeste do país (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2017).

Como, em teoria, o câncer pode se originar de todos os tipos celulares, ele ocorre em quase todos os tecidos do corpo (WEINBERG, 2008). Por conta disso, o Sistema Nervoso Central (SNC) também é acometido por neoplasias, sendo um grupo formado por diferentes tipos, como gliomas, ependimomas, gangliogliomas, pineocitomas, meduloblastomas, schwannomas, dentre outros (LOUIS et al., 2016).

Não há fatores de risco ambientais ou relacionados ao estilo de vida bem documentados associados ao aparecimento de câncer (STEWART; WILD, 2014). Porém estudos relatam que alguns fatores, como radiação terapêutica na cabeça e no pescoço, exposição a campos eletromagnéticos e a carcinógenos ambientais, consumo de alimentos contendo nitrito de sódio e infecções virais podem aumentar o aparecimento desses tumores (OHGAKI; KLEIHUES, 2005; STEWART; WILD, 2014; VILLENEUVE et al., 2002). Já outros, viram que alguns tipos de alergias podem prevenir o desenvolvimento de gliomas (CHEN et al., 2011). A associação do uso de telefone celular com o risco de tumores cerebrais ainda é controversa, apesar de ser classificado como possivelmente carcinogênico a humanos (Grupo 2B). Porém, trabalhos já verificaram que o uso ipsilateral de telefone pode aumentar o risco de desenvolver gliomas (BAAN et al., 2011).

Os tumores do SNC são os mais comuns em crianças de 0 a 14 anos e o terceiro em adolescentes e jovens adultos, na faixa de 15 a 39 anos (5,54 e 10,94 a cada 100.000 habitantes, respectivamente). Mas o número de diagnósticos é maior em pessoas com mais de 40 anos, com incidência de 40,82 a cada 100.000 habitantes (OSTROM et al., 2017).

Esse conjunto de tumores é o 14º mais comum entre os homens e o 15º entre as mulheres (JEMAL et al., 2017). E, apesar de representar menos de 2% das incidências de câncer, tem uma alta taxa de mortalidade (STEWART; WILD, 2014). No Brasil, os tumores do SNC ocupam a 10ª posição entre homens e a 9ª entre as mulheres, com um total de 9.033 óbitos no ano de 2015 e uma estimativa de 11.320 novos casos em 2018. Também ocupa a 2ª posição de incidência em crianças entre 0 e 14 anos (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2017). Os gliomas correspondem ao tipo de tumor maligno mais frequente no SNC, correspondendo a 26,6% de todos os tumores do SNC e a 80,9% dos tumores malignos do SNC.

1.2 GLIOMAS

Os gliomas são tumores do SNC provenientes de células da glia (astrócitos, oligodendrócitos, células da micróglia e células ependimárias) ou de suas progenitoras, devido a sua semelhança com essas, inclusive expressando marcadores gliais (JIANG; UHRBOM, 2012). De acordo com o Centro de Registro de Tumores no Cérebro dos Estados Unidos (CBTRUS), essas neoplasias incluem astrocitomas, oligodendrogliomas, ependimomas, oligoastrocitomas, tumores não especificados e algumas histologias raras (OSTROM et al., 2017).

É mais comum em homens do que em mulheres, em proporção de 3:1. Em relação à etnia, brancos são mais acometidos do que negros, com a taxa de risco diferindo de acordo com o tipo de glioma. Em alguns subtipos, como oligodendroma, a taxa chega a ser de 2,5 vezes maior (OSTROM et al., 2017).

A OMS categoriza, classicamente, os gliomas mais comuns em quatro graus de acordo com a sua histopatologia, conforme mostra o Quadro 1 (LOUIS et al., 2007). Os tumores de alto grau (III e IV) são definidos como mais agressivos e com piores prognósticos do que os de baixo grau (I e II) (HUSE; HOLLAND, 2010).

Quadro 1 - Classificação dos subtipos de gliomas. Os gliomas são classificados de acordo com suas características histológicas feita pela Organização Mundial da Saúde (adaptado de JONES; HOLLAND, 2011).

	Grau OMS	Histopatologia tumoral	Subtipo de acordo com a histopatologia
Baixo grau	I	Benigno, bem definido	Astrocitoma pilocítico
Baixo grau	II	Infiltração difusa e alta proliferação	Astrocitoma difuso, Oligodendroglioma, Oligoastrocitoma
Alto grau	III	Muito infiltrativo e com muita proliferação	Astrocitoma anaplásico, Oligoastrocitoma anaplásico, Oligodendroglioma anaplásico
Alto grau	IV	Muito infiltrativo, proliferação celular e vascular elevada, necrose, hemorragia	Glioblastoma multiforme

1.3 GLIOBLASTOMA MULTIFORME

O glioblastoma multiforme (GBM) é o mais agressivo e o mais comum entre os gliomas, tendo os piores prognósticos (ALCANTARA LLAGUNO; PARADA, 2016). Em números, representa 56,1% dos gliomas. É diagnosticado, em média, aos 64 anos de idade (OSTROM et al., 2017).

Recentemente, a OMS fez uma nova classificação de gliomas, levando em consideração diversas características moleculares. Segundo essa classificação, o GBM foi dividido em 3 tipos, de acordo com a enzima isocitrato desidrogenase 1 (IDH1) encontrada (LOUIS et al., 2016). A IDH1 transforma o isocitrato a α -cetoglutarato no citosol, formando também NADPH a partir de NADP^+ (POLLARD; RATCLIFFE, 2009). A IDH1 mutada também tem a característica de transformar α -cetoglutarato em 2-hidroxiglutarato que, em altas concentrações, pode contribuir para a progressão do glioma (OHGAKI; KLEIHUES, 2013).

Os GBMs primários, que correspondem a 90% dos casos, ocorrem de forma espontânea e contém o gene *IDH1* selvagem, sendo mais comum em pacientes acima dos 55 anos. Já os GBMs secundários são derivados de gliomas de menores graus, como astrocitoma difuso e astrocitoma anaplásico, tendo o *IDH1* mutado e preferência por pessoas mais novas. Há ainda os GBMs não especificados, que são os que não permitem uma avaliação completa do *IDH1*. Também existem diferenças nos genes *TP53* e *PTEN* e no receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (LOUIS et al., 2016; OHGAKI; KLEIHUES, 2013).

Quanto à histo e citologia, os GBMs apresentam atividade mitótica, atipia nuclear, áreas de necrose e de proliferação multivascular (WEN; KESARI, 2008). Além disso, as células possuem formato poligonal ou fusiformes, hipercromia da cromatina, pleomorfismo nuclear, membrana nuclear irregular e núcleo distinto. Algumas ainda podem apresentar dois ou mais núcleos. Em sua composição celular, pode haver linfócitos, neutrófilos e células necróticas (SCHULTZ et al., 2005).

O procedimento terapêutico após o diagnóstico do GBM é a ressecção cirúrgica, seguida por radio e/ou quimioterapia (CWIKLOWSKA et al., 2018). A média de sobrevida dos pacientes que tiveram apenas cirurgia é de apenas 3 meses e meio, aumentada para 9 meses com a radioterapia (SALAZAR et al., 1979). Já a combinação da radioterapia com a quimioterapia após a ressecção, aumenta a sobrevida para até 14,6 meses (STUPP; VAN DEN BENT; HEGI, 2005).

O fármaco mais utilizado na quimioterapia é a temozolomida (TMZ). Ela é um agente alquilante oral, que quebra a dupla-fita de DNA, parando o ciclo celular e levando as células à apoptose. No entanto, a TMZ também pode causar mielotoxicidade, alergias respiratórias, defeitos no nascimento e toxicidade em células-tronco hematopoiéticas (DE et al., 2018).

Porém, mesmo com todos os avanços no tratamento, as taxas de sobrevida são curtas, pois apenas 5,5% dos pacientes acometidos por GBM apresentam sobrevida de cinco anos após o diagnóstico e 2,9% sobrevivem por dez anos (OSTROM et al., 2017).

As taxas curtas de sobrevida se devem à recidiva rápida do tumor, que deriva de alguns fatores, como a presença de células-tronco tumorais (CSCs), as quais têm características de evasão às terapias e também são capazes de repopular o local (BAO et al., 2006; CHEN et al., 2012); a alta capacidade de invasão do GBM, dificultando a ressecção total e a eficiência da radioterapia, permitindo a recorrência do tumor (que ocorre com até 2 cm de área residual do GBM) (LI et al., 2016; ZHANG et al., 2018); e a presença da barreira hematoencefálica (BHE), que limita a procura por quimioterápicos (GROOTHUIS, 2000). Assim, mesmo com os avanços nos tratamentos atuais, os prognósticos são muito desfavoráveis. Por conta disso, a busca por tratamentos alternativos ou adjuvantes estão em foco atualmente e muitas substâncias com fonte vegetal têm sido estudadas neste sentido.

1.4 FUCOXANTINA

Diversos compostos naturais presentes em alimentos são considerados potenciais agentes quimiopreventivos (TANAKA; SHNIMIZU; MORIWAKI, 2012). Um desses compostos é a fucoxantina (Fx), um carotenoide alaranjado que é encontrado em algas pardas e diatomáceas (PENG et al., 2011), responsável por mais de 10% da produção de carotenoides na natureza, sendo um dos mais abundantes (DEMBITSKY; MAOKA, 2007). Em sua estrutura química (Figura 2), a Fx possui uma ligação alênica, 5,6-monoepóxido e um grupo acetila (SATOMI, 2017).

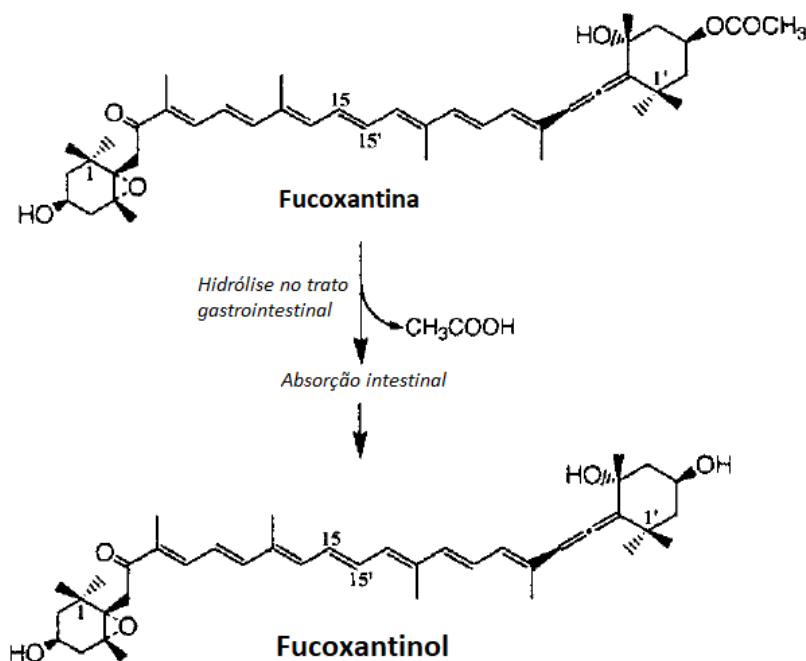
Estudos demonstraram que a incidência de tumores cerebrais (inclusive gliomas) é menor em populações asiáticas em comparação com outros lugares do mundo como Europa e América do Norte (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2014; KURATSU; TAKESHIMA; USHIO, 2011). Uma das discussões para isso é a alimentação dos povos asiáticos (SHO, 2001) que, além de outras coisas, é rica em algas pardas, como wakame (*Undaria pinnatifida*) e konbu (*Laminaria japonica*), as quais possuem Fx em grande quantidade (SATOMI, 2017).

Para a Fx, já foram descritos efeitos antioxidantes (SACHINDRA et al., 2007; ZHANG et al., 2014), antiobesidade (ABIDOV et al., 2010; HU et al., 2012), antidiabéticos (MIKAMI et al., 2017), neuroprotetores (HU et al., 2018; ZHANG et al., 2017) e anticâncer. Este último foi observado em câncer de pulmão (MEI et al., 2017), leucemia (HOSOKAWA et al., 1999), hepatocarcinoma (DAS; HASHIMOTO; KANAZAWA, 2008), câncer de cólon (HOSOKAWA et al., 2004), dentre outros (MIKAMI; HOSOKAWA, 2013). Esses efeitos também foram observados em glioblastoma multiforme, através da diminuição da migração e da invasão celulares, da viabilidade celular e do aumento de apoptose (LIU et al., 2016; LOPES, 2018).

A Fx também demonstrou ser segura para tecidos saudáveis (BEPPU et al., 2009; LOPES, 2018) e capaz de atravessar a BHE (XIANG et al., 2017).

Além do mais, a Fx é metabolizada em fucoxantinol (FxOH) (Figura 1) ao ser ingerida (ASAI et al., 2004), substância essa que já mostrou melhores resultados anticâncer (KONISHI et al., 2006; MARTIN, 2015).

Figura 1 - Transformação da fucoxantina em fucoxantinol em mamíferos. Adaptado de ASAI et al. (2004).



Embora existam muitos avanços no tratamento convencional de GBM, a média de sobrevida dos pacientes não ultrapassa os 14 meses, sendo apenas uma questão paliativa. Além disso, os efeitos colaterais são grandes e não dão a qualidade de vida adequada. Portanto, a

busca por tratamentos alternativos ou adjuvantes é bem vista, e a Fx apresenta requisitos para que possa ser usada para o combate ao GBM no futuro.

Contudo, apesar dos efeitos benéficos apresentados pela Fx, eles não são muito bem entendidos. Processos biológicos como a migração celular são diretamente envolvidos na malignidade e agressividade de GBM e de tumores em geral e, assim, novos agentes terapêuticos, como a Fx, devem ser estudados para elucidar como esses mecanismos ocorrem.

1.5 MIGRAÇÃO E ADESÃO CELULAR DE GBM

Como dito anteriormente, uma das causas para o prognóstico ruim dos pacientes com GBM é a difícil ressecção total. Isso porque a não remoção completa leva a uma recidiva do tumor em 11 meses, em média (GUPTA et al., 2012). O que torna a ressecção total do GBM tão complicada é a sua característica de invasão nos tecidos peritumorais, viabilizada pela migração celular (JUSTUS et al., 2014), e pela nobreza do tecido circundante.

Para migrarem, as células passam por grandes mudanças biológicas, como perda de adesão célula-célula e ganho de mobilidade, de habilidade de degradar a matriz extracelular (MEC) e de propriedades de células-tronco. Com isso, podem invadir os espaços perivasculares ou o parênquima cerebral (espaço entre os neurônios e as células gliais) (PAW et al., 2015).

Como esses espaços podem ser muito pequenos, as células tumorais mudam sua forma e seu volume (este podendo ser reduzido em até 33%), através da saída ou entrada de água, mediada pelo transporte de Cl^- (CUDDAPAH et al., 2014; WATKINS; SONTHEIMER, 2011). Outro estudo ainda demonstra que o cotransportador de Na-K-Cl 1 (NKCC1) está relacionado com o potencial migratório das células de glioma (GARZON-MUVDI et al., 2012).

O crescimento dos tumores cerebrais é limitado pela caixa craniana e, por isso, as células cancerígenas devem ter outros mecanismos para contornar esse problema. Uma das propostas é a da excitotoxicidade glutamatérgica, em que as células neoplásicas liberam – e deixam de captar – glutamato, o qual se acumula no espaço extracelular e causa a morte do tecido adjacente (NOCH; KHALILI, 2009). Ye, Rothstein & Sontheimer (1999) demonstraram que células de glioma expressam menos transportadores dependentes de Na^+ GLT-1 (que capta glutamato) do que astrócitos saudáveis.

Apesar da alta capacidade de invasão, por muito tempo se discutiu que o GBM não tinha característica de metástase, sendo esta reportada em menos de 2% dos casos (BEAUCHESNE, 2011). Isso se daria por conta da rápida progressão do tumor, da presença da BHE, da falta de vasos linfáticos no SNC e pelas diferenças entre o tecido do SNC e do resto do corpo (AWAN

et al., 2015). Entretanto, Müller e colaboradores (2014) observaram células tumorais circulantes em 20,6% dos pacientes que receberam doações de órgãos de pessoas com GBM, gerando discussões sobre o assunto.

A MEC também tem papel importante na característica adesiva e migratória das células (FRANTZ; STEWART; WEAVER, 2010), pois suas moléculas de adesão estão associadas ao citoesqueleto (SCHMIDT; FRIEDL, 2010).

1.6 MATRIZ EXTRACELULAR EM GBM

A MEC é uma rede tridimensional complexa, composta principalmente por colágeno, laminina, fibronectina, elastina, proteoglicanos e outras glicoproteínas, organizada de forma diferente em cada tipo de tecido (JARVELAINEN et al., 2009). A MEC é importante em funções como morfogênese, diferenciação e homeostase dos tecidos, iniciando gatilhos bioquímicos e biomecânicos, além de prover suporte físico para as células (FRANTZ; STEWART; WEAVER, 2010).

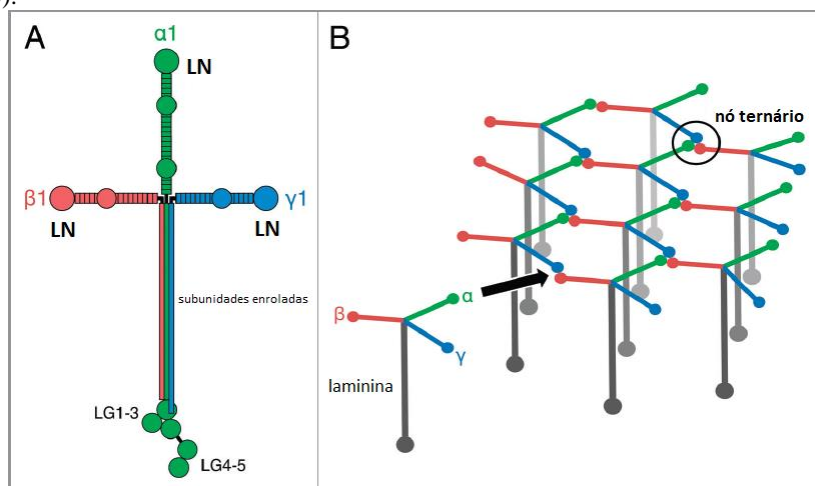
As células permanecem em seus lugares devido à junção com outras células vizinhas e com a MEC por interações eletrostáticas e por moléculas de adesão celular. A ligação da célula com a MEC se dá através de receptores de adesão da membrana celular com os componentes da matriz (LODISH et al., 2014; TREPAT; CHEN; JACOBSON, 2012).

Os principais receptores de adesão são as integrinas, que fazem o processo de adesão celular e também mediam a sinalização de fora da célula para o seu interior e vice-versa (JONES; WALKER, 1999; KIM; TURNBULL; GUIMOND, 2011). As integrinas são proteínas transmembrana, que reconhecem proteínas da MEC com sequências curtas de aminoácidos (TREPAT; CHEN; JACOBSON, 2012). Por conta dessas funções, já é discutido o papel das integrinas e da adesão celular em diversas doenças, inclusive na migração e na metástase de cânceres (JONES; WALKER, 1999).

Existem diversos tipos de integrinas, pois são heterodímeros formados por uma subunidade α e uma β , sendo que também existem diversos subtipos de cada uma delas (PLOW et al., 2000). Em razão disso, é difícil saber qual integrina está associada a cada distúrbio. Porém já foram identificadas integrinas específicas associadas à migração em melanoma (FILARDO et al., 1995), câncer de pulmão (LAKSHMANAN et al., 2016), câncer de mama (HEDRICK et al., 2016) e glioma (FUKUSHIMA et al., 1998). Alguns elementos da MEC, como a laminina e a fibronectina, que se ligam às integrinas, também podem apresentar papel importante na patologia desses tipos de cânceres (TAVELLA et al., 1997).

A laminina é um dos principais integrantes da membrana basal – MEC especializada na organização de tecidos e formação de órgãos, localizada adjacente ao endotélio e ao epitélio e ao redor dos músculos e tecido adiposo (MORRISSEY; SHERWOOD, 2015). A laminina é um heterotrímero, composto por uma cadeia α , uma β e uma γ (cada uma com mais de um tipo), fazendo com que existam 16 isoformas desta molécula. Sua estrutura (Figura 2A) é dividida em um braço longo (composto pelas 3 cadeias) e três braços curtos (cada um formado por uma das cadeias) (HOHENESTER; YURCHENCO, 2013). A laminina é o principal componente da membrana basal relacionado com a adesão célula-MEC, contendo seu braço longo ligado às moléculas de adesão na membrana celular (principalmente integrinas) e seus braços curtos ligados a outras lamininas e demais componentes da matriz (Figura 2B) (HOHENESTER; YURCHENCO, 2013).

Figura 2 - Estrutura esquemática da laminina e seu posicionamento na membrana basal. (A) Estrutura esquemática da laminina. Composta por 3 cadeias: α (verde), β (vermelho) e γ (azul). Cada um dos seus três braços curtos é composto por uma cadeia e seu braço longo é formado pela ligação de todas elas. (B) Arranjo das lamininas para formar uma rede na membrana basal. O nó ternário é formado pela ligação de uma cadeia α , uma β e uma γ . O braço longo se liga a receptores de membrana nas células (geralmente integrinas) (adaptado de HOHENESTER; YURCHENCO, 2013).

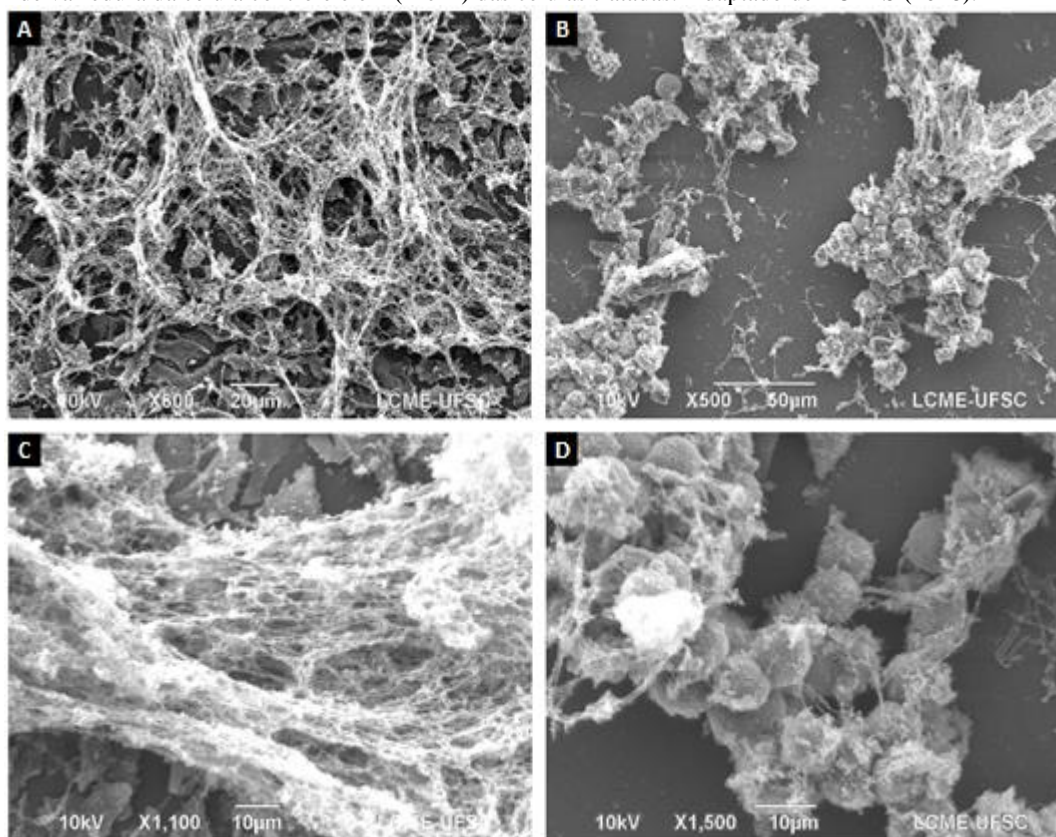


Devido à sua interação com as integrinas, é provável que a laminina tenha um papel importante na adesão e na migração celulares. Díaz de la Loza e colaboradores (2017) demonstraram a relação entre a concentração de laminina e a interação integrina-laminina com a migração em células foliculares de *Drosophila*. Em câncer, a influência da laminina é incerta, tendo trabalhos que observaram efeitos pró e anti-invasão (RAMOVIS; TE MOLDER; SONNENBERG, 2017). A laminina-5, por exemplo, está relacionada à invasão de células de câncer de mama e de próstata quando está pouco expressa, enquanto aumenta a invasão em hepatocarcinoma quando está superexpressa (GIANNELLI; ANTONACI, 2000). Em gliomas, a Laminina-5 está mais expressa na borda invasiva do tumor (JOURQUIN et al., 2010) e as

lamininas que contêm as subunidades $\alpha 3$ e $\alpha 5$ estão envolvidas na invasão (KAWATAKI et al., 2007), por exemplo.

Lopes (2018) observou, por microscopia eletrônica de varredura, uma drástica redução na MEC em células GBM1, após o tratamento com Fx (Figura 3). Desta forma, levando-se em consideração as possíveis ações antitumorais da fucoxantina, estudos que procurem elucidar os efeitos deste composto sobre moléculas de MEC, como a laminina, dos GBM e, conseqüentemente, sobre os processos de adesão e migração celular, são fundamentais na busca de ferramentas para o tratamento do GBM.

Figura 3 – Diminuição da matriz extracelular em células tratadas com fucoxantina. Após confluência as células GBM1 foram tratadas com 100 μ M de Fx por 24 horas, preparadas e visualizadas em microscópio eletrônico. (A e C) Imagem de varredura da célula controle e em (B e D) das células tratadas. Adaptado de LOPES (2018).



1.7 OBJETIVOS

1.7.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da fucoxantina em células de glioblastoma multiforme humano (GBM1), e na expressão da laminina nestes processos.

1.7.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da fucoxantina sobre a viabilidade das células GBM1;
- Analisar a adesão de células GBM1 em matriz extracelular de células GBM1 tratadas com Fx;
- Verificar o efeito da fucoxantina na distribuição de laminina em células GBM1.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 CULTURA CELULAR

Uma amostra de glioblastoma multiforme (GBM1) foi cirurgicamente retirada de paciente do sexo feminino, de 64 anos, do hospital Celso Ramos, em Florianópolis, Santa Catarina no ano de 2012 - o diagnóstico de glioblastoma multiforme foi posteriormente feito histopatologicamente pelos especialistas. A amostra foi coletada por cirurgiões e colocada em tubos cônicos de 15 ml contendo *Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12* (DMEM-F12) e 10% de soro bovino fetal (SBF) e a amostra foi levada à Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) para posterior processamento. Em um fluxo laminar, removeu-se as meninges cerebrais e vasos sanguíneos. O tecido foi dissociado mecanicamente com tripsina e auxílio de uma pipeta Pasteur. Então as células foram lavadas com tampão fosfato-salino (PBS) e cultivadas em garrafas de cultura de 25 cm², contendo DMEM-F12 acrescido de glicose (0,6%), glutamina (2 mM), bicarbonato de sódio (0,06%) e penicilina/estreptomicina (1 U/1 µg) e suplementado com 10% de SBF. As células foram mantidas em estufa de atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37°C. Todos os procedimentos e formulários de autorização para obtenção das amostras foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC (CEPSH – 108.286) (Anexo).

2.2 FUCOXANTINA

A fucoxantina foi obtida do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal, Departamento de Fitotecnia, CCA/UFSC, cedida pelo Prof. Marcelo Maraschin e a Me. Cláudia Marlene Bauer.

Para extrair a fucoxantina, as biomassas da espécie *Phaeodactylum tricornutum*, fornecidas pelo Prof. Roberto Bianchini Derner e pelo Dr. Rafael Garcia Lopes do Laboratório de Cultivo de Algas, Departamento de Aquicultura, CCA/UFSC, foram dissolvidas utilizando solvente orgânico (metanol). Na sequência, os extratos metanólicos foram filtrados em suporte com filtro de celulose, sob vácuo, e foram purificados conforme Bauer (2016). O grau de pureza do extrato foi de 97% após a purificação.

A fucoxantina foi utilizada nos experimentos na concentração de 100 µM, baseado nos resultados de Lopes (2018) e solubilizada em dimetil-sulfóxido (DMSO).

2.3 VIABILIDADE CELULAR

Para avaliar o efeito da fucoxantina na viabilidade das células de GBM1, foi realizado o ensaio de redução do MTT ((3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazol brometo). O MTT é um sal de tetrazólio amarelo, solúvel em água, que é reduzido em formazan, composto roxo escuro, formando precipitados. O formazan pode ser avaliado colorimetricamente depois de solubilizado DMSO (STEPANENKO; DMITRENKO, 2015).

As células GBM1 (entre 30 e 40 passagens) foram plaqueadas em placas de 96 poços (10^5 células por poço). Após a confluência (~ 24 h), o meio de cultura foi removido e as células foram divididas em 3 grupos: grupo controle (apenas DMEM F-12), grupo veículo (DMEM F-12 + DMSO) e grupo tratado (DMEM F-12 + Fx 100 μ M). 24 h depois, o meio de cultura foi removido e MTT (0,2 mg/mL em PBS) foi adicionado. As células permaneceram incubadas por 2 h a 37 °C. Depois, o MTT foi retirado e adicionou-se DMSO para solubilizar os cristais de formazan formados. Na sequência, a absorbância das placas foi lida através de espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm. A viabilidade celular foi proporcional à absorbância. O experimento teve 3 repetições com triplicata.

2.4 ADESÃO CELULAR

A adesão celular foi avaliada plaqueando-se as células GBM1 (entre 20 e 30 passagens) em placas de 96 poços (10^5 células por poço; DMEM F-12 10% de SBF). Depois de confluentes (~ 24 h), o meio de cultura foi retirado e as células foram divididas em 3 grupos: grupo controle (DMEM F-12), grupo veículo (DMEM F-12 + DMSO) e grupo tratado (DMEM F-12 + Fx 100 μ M). Após 24 h, os meios com os tratamentos foram retirados e 50 μ L de H₂O ultrapura autoclavada foram adicionados para lisar as células por 5 minutos, de modo que restasse apenas a matriz extracelular. Na sequência, a água foi retirada e novas células GBM1 foram plaqueadas (10^4 células por poço; DMEM F-12 1% de SBF).

6 h, 12 h ou 24 h depois, o teste de adesão foi realizado. O meio de cultura foi retirado e os poços lavados gentilmente três vezes com PBS. Em seguida, 50 μ L de paraformaldeído 4% foram adicionados e mantidos por 10 minutos para a fixação das células. Os poços foram novamente lavados três vezes com PBS. Então, as células foram incubadas com 50 μ L de cristal violeta 0,5% (em 20% de metanol), por 10 minutos, para a coloração. Mais três lavagens com PBS foram feitas e foram adicionados 50 μ L de citrato de sódio (50% metanol, 50% H₂O

destilada; pH = 4,2) para eluir o corante. Por último, a placa foi lida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm. O experimento teve 3 repetições com quintuplicata.

2.5 IMUNOCITOQUÍMICA

A observação da estrutura da matriz extracelular foi realizada através de imunofluorescência para laminina.

As células GBM1 (entre 20 e 30 passagens) foram plaqueadas em lamínulas redondas estéreis dentro de placas de 24 poços ($2,5 \times 10^5$ células por poço). Depois de confluentes (~ 24 h), foram separadas em 2 grupos: grupo controle (DMEM F-12) e grupo tratado (DMEM F-12 + Fx 100 μ M). 24 horas depois, o meio foi retirado e as células fixadas com paraformaldeído 4% por 15 minutos. Após 3 lavagens com PBS, os sítios específicos das células foram bloqueados com albumina e, em seguida, incubadas com anticorpo anti-laminina (diluição 1:400; Abcam AB11575) *overnight* a 4 °C em câmara úmida. Depois, foram feitas 3 lavagens com PBS com Tween 20 (PBST 0,1%) e incubação com anticorpo secundário conjugado com fluoróforo (diluição 1:1000; Alexa Fluor-488 anti-rabbit) por 1 hora em temperatura ambiente. Na sequência, foram realizadas mais 3 lavagens com PBST e incubação com Hoescht (5 μ g/mL) por 10 minutos para marcar os núcleos totais. Outras 3 lavagens com PBS e uma com água destilada. Por último, as lamínulas foram colocadas em lâminas e foram fotografadas em microscópio invertido de fluorescência (Olympus BX41; Olympus, Japão). Não foi utilizado grupo veículo, pois não foi observado efeito em relação ao grupo controle nos ensaios anteriores. Os experimentos foram feitos em duplicatas e foram realizadas pelo menos 10 fotografias randômicas de cada lamínula. Foram realizados controles negativos dos experimentos, sem a incubação com o anticorpo primário, mas com a realização de todos os outros passos do experimento.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

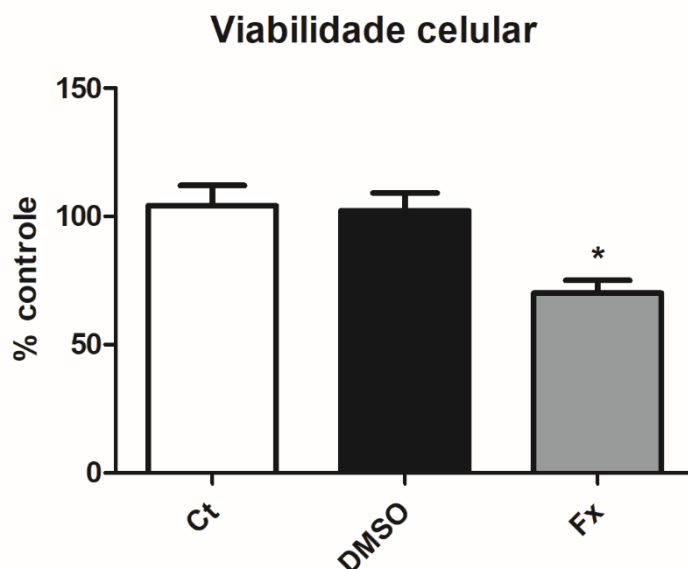
A análise estatística foi feita por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Newman-Keuls. Os dados foram expressos como média com erro padrão. O *software* usado foi o GraphPad Prism 5 e valores $p < 0,05$ foram considerados significativos.

3 RESULTADOS

3.1 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR

Para demonstrar o efeito citotóxico da fucoxantina, o ensaio de MTT foi feito após 24 h de tratamento com o composto a 100 μ M. Observamos que, após o tratamento com Fx, a viabilidade das células de GBM1 foi reduzida em aproximadamente 30%, em relação às células não tratadas (Figura 4).

Figura 4 - Fucoxantina reduz a viabilidade celular de células GBM1. Após confluência, as células GBM1 foram tratadas com Fx 100 μ M e, após 24 h, o ensaio de MTT foi realizado. Os controles foram incubados com meio de cultura e o veículo, com DMSO, pelo mesmo período. Dados expressos como média + erro padrão. * $p < 0,05$ representa significância em relação ao controle (ANOVA de uma via seguida de teste de Newman-Keuls); $n = 3$, em experimentos independentes.



3.2 DETERMINAÇÃO DA ADESÃO CELULAR

A adesão celular é um importante processo envolvido na invasão e/ou migração das células tumorais ao tecido adjacente, o que também é relacionado à secreção de moléculas de MEC. Buscando observar se há diferença na adesão das células de GBM1 após o tratamento com Fx, foram realizados testes de adesão de 6 h, 12 h e 24 h após o tratamento, em células GBM1 replaqueadas na MEC de células GBM1 sem ou com tratamento de 24 h com fucoxantina 100 μ M.

Foi observado que, após 6 h e 12 h do replaqueamento das células, a Fx não alterou a adesão das células GBM1 (Figuras 5 e 6). No entanto, no ensaio feito após 24 h, a Fx reduziu significativamente a adesão celular (Figura 7).

Figura 5 - Fucoxantina não altera a adesão das células GBM1 depois de 6 h. Após confluência, as células de GBM1 foram tratadas com Fx 100 μ M por 24 h. Depois, as células foram lisadas para que restasse apenas a matriz extracelular e novas células GBM1 foram replaqueadas sobre a MEC. Após 6 h, o teste de adesão foi feito. Os controles foram incubados com meio de cultura e o veículo, com DMSO, pelo mesmo período. Dados expressos como média + erro padrão. * $p < 0,05$ representa significância em relação ao controle (ANOVA de uma via seguida de teste de Newman-Keuls); $n = 3$, em experimentos independentes.

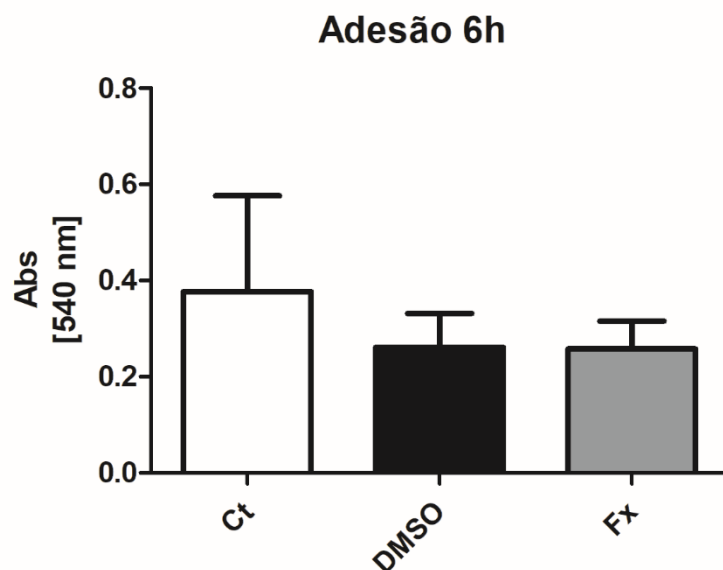


Figura 6 - Fucoxantina não altera a adesão das células GBM1 depois de 12 h. Após confluência, as células de GBM1 foram tratadas com Fx 100 μ M por 24 h. Depois, as células foram lisadas para que restasse apenas a matriz extracelular e novas células GBM1 foram replaqueadas sobre a MEC. Após 12 h, o teste de adesão foi feito. Os controles foram incubados com meio de cultura e o veículo, com DMSO, pelo mesmo período. Dados expressos como média + erro padrão. * $p < 0,05$ representa significância em relação ao controle (ANOVA de uma via seguida de teste de Newman-Keuls); $n = 3$ em experimentos independentes.

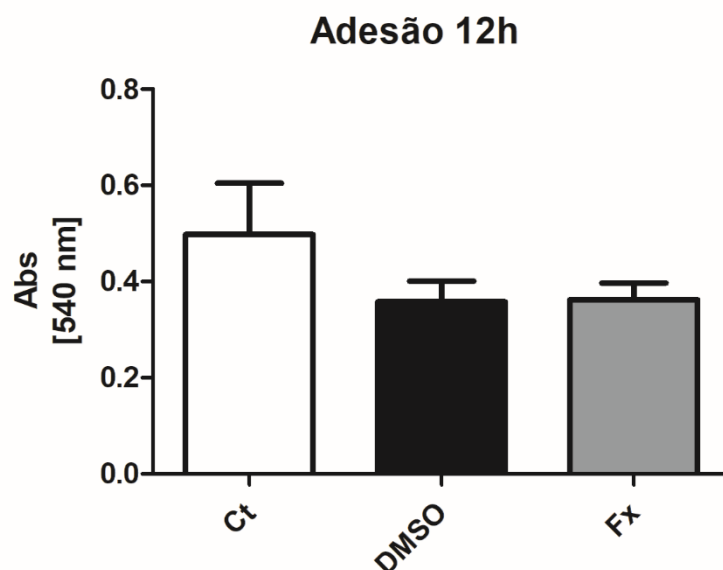
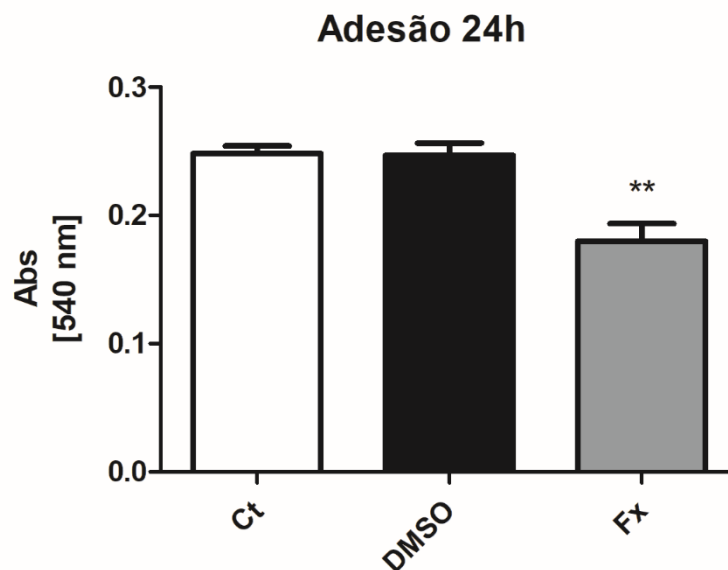


Figura 7 – Fucoxantina reduz a adesão de células GBM1 depois de 24 h. Após confluência, as células de GBM1 foram tratadas com Fx 100 μ M por 24 h. Depois, as células foram lisadas para que restasse apenas a matriz extracelular e novas células GBM1 foram replaqueadas sobre a MEC. Após 24 h, o teste de adesão foi feito. Os controles foram incubados com meio de cultura e o veículo, com DMSO, pelo mesmo período. Dados expressos como média + erro padrão. * $p < 0,05$ representa significância em relação ao controle (ANOVA de uma via seguida de teste de Newman-Keuls); $n = 3$, em experimentos independentes.

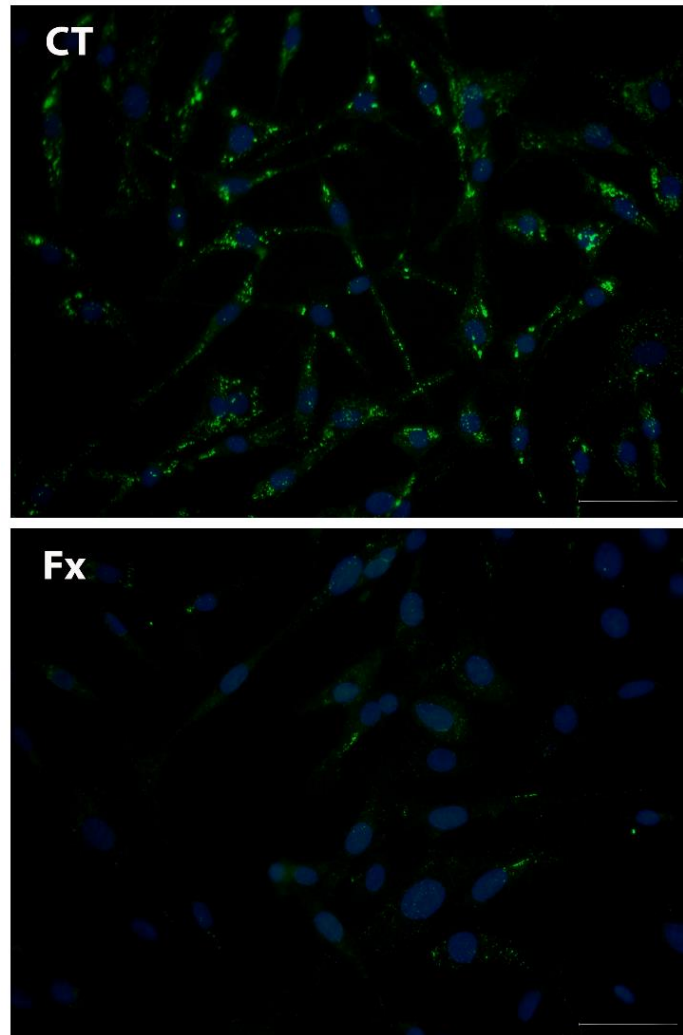


3.3 AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DE LAMININA

Para analisar se existem alterações na distribuição de laminina nas células de GBM1 após o tratamento com Fx, foi realizada a imunocitoquímica com anticorpo específico para essa molécula de MEC.

Embora este experimento não seja quantitativo, pode-se observar que a marcação para laminina é reduzida drasticamente após o tratamento com Fx (Figura 8).

Figura 8 – Fucoxantina reduz a marcação de laminina. Células GBM1 foram plaqueadas em lamínulas estéreis em placas de 24 poços. Após a confluência, foram tratadas com Fx 100 μM por 24 h. Depois, foram fixadas, e incubadas com anticorpo primário antilaminina. Na sequência, foram incubadas com anticorpo secundário com fluoróforo por 1 h em temperatura ambiente e com Hoescht por 10 minutos na mesma temperatura. As lamínulas foram colocadas em lâminas e levadas ao microscópio de fluorescência. Os controles foram incubados com meio de cultura pelo mesmo período. Barra = 50 μM . n = 2, em experimentos independentes.



4 DISCUSSÃO

Diversos estudos já demonstraram o efeito citotóxico da fucoxantina em células tumorais. Em hepatocarcinoma, a Fx diminui a viabilidade celular nas concentrações de 25 e 50 μM em 24 h (DAS; HASHIMOTO; KANAZAWA, 2008). Já em câncer de bexiga, a Fx em concentrações de 5, 10, 20 e 40 μM reduz a viabilidade depois de 48 h (WANG et al., 2014). Na concentração de 100 μM , a Fx diminui a viabilidade em células de câncer gástrico em 24 h (ZHU et al., 2018) e em células de câncer de cólon em 48 h e 72 h (LOPES-COSTA et al., 2017).

A concentração de Fx para o presente trabalho foi estabelecida de acordo com os resultados obtidos por LOPES (2018) em células GBM1 e em linhagens A172 e C6 de GBM. Como visto pelo ensaio de MTT, Fx na concentração de 100 μM foi capaz de diminuir a viabilidade celular de GBM1 em cerca de 30%. Este resultado corrobora dados em que a viabilidade de células GBM1 diminui em aproximadamente 50% depois de tratadas por 24 h com Fx 100 μM (LOPES, 2018). Também foi vista a redução da viabilidade em outras linhagens de GBM (U87 e U251) com a mesma concentração e tempo (LIU et al., 2016). No entanto, nos trabalhos citados, os efeitos citotóxicos ficaram restritos às células tumorais, não afetando as saudáveis ou com alterações não significativas.

O prognóstico ruim do GBM está muito relacionado com a capacidade invasiva de suas células, que torna os limites entre o tumor e o tecido normal indistiguíveis, dificultando a ressecção total e aumentando os riscos de recorrência (ZHANG et al., 2018). Neste sentido, efeitos antimigratórios da Fx já foram descritos em linhagens de células de melanoma (CHUNG et al., 2013), de osteosarcoma (ROKKAKU et al., 2013) e de GBM (LIU et al., 2016; LOPES, 2018).

Uma vez que a migração celular está diretamente ligada à adesão das células ao substrato, essa característica foi avaliada. Observamos que a Fx reduziu significativamente a adesão celular 24 h após o replaquamento, o que pode ser causado por alterações na matriz extracelular em que elas se aderiram. A diminuição da adesão celular causada pela Fx foi demonstrada por CHUNG et al. (2013) em células de melanoma, o que foi relacionado, por esses autores, à diminuição da migração celular.

Buscando saber se a diminuição da adesão celular está relacionada a alterações na MEC, a distribuição de laminina foi analisada. A associação da laminina com o aumento na migração celular já foi descrita em câncer de pulmão (GU et al., 2001) e em carcinomas de células escamosas da pele (ZHOU; KRAMER, 2005), em câncer gástrico (ARITA et al., 2016) e em

glioma (GRITSENKO; FRIEDL, 2018). No presente trabalho, foi observada a diminuição da marcação de laminina por células tratadas com Fx em relação ao controle. Com isso, podemos sugerir que o efeito antimigratório da Fx pode estar relacionado com o seu efeito em diminuir a adesão celular, que, por sua vez, pode ser causado pela diminuição da produção de laminina. É importante salientar que as imagens analisadas continham quantidade de células semelhante, e, dessa forma, pode-se dizer que a redução na marcação para laminina não ocorreu pela diminuição do número de células.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que a Fx revelou ser um composto redutor de viabilidade celular e de adesão celular, sendo este efeito, possivelmente, pelo menos em parte, explicado pela alteração na distribuição de laminina, uma importante molécula de MEC envolvida em processos de migração celular. Ainda, os efeitos observados neste trabalho, são corroborados pelos resultados encontrados por Lopes (2018), onde foi observado que a Fx é um potente indutor de apoptose, com propriedades antiproliferativas, de anti-invasão e anti-angiogênicas em células de glioblastoma primário, o qual foi o primeiro estudo a trabalhar essas questões. Com base nestes achados, é tentador especular que a Fx isolada ou em combinação com outros quimioterápicos convencionais possa ser potencialmente útil no tratamento do GBM.

Contudo, mais pesquisas devem ser feitas para elucidar os mecanismos responsáveis pelos efeitos antimigratórios da fucoxantina, bem como para observar os reais efeitos da laminina e de outras moléculas da matriz extracelular no processo de migração em células de glioblastoma multiforme.

5 CONCLUSÕES

- A fucoxantina reduz a viabilidade das células GBM1;
- Fx diminui a adesão de células GBM1 na matriz extracelular depois de 24 h;
- O tratamento com Fx altera a distribuição de laminina pelas células GBM1.

6 PERSPECTIVAS

- Determinação da ação da Fx na expressão e distribuição de laminina e de outras moléculas presentes na matriz extracelular, como a fibronectina;
- Avaliação do envolvimento de integrinas, como a integrina $\alpha 5$, nos processos de adesão e migração celular;
- Verificação das vias intracelulares de sinalização envolvidas nestes processos, como mTOR, AKT e ERK;
- Análise do efeito da Fx sobre a expressão de moléculas que degradam matriz extracelular, como as metaloproteinases de matriz (MMP) 2 e 9, com o objetivo de elucidar os mecanismos envolvidos na migração destas células.

REFERÊNCIAS

ABIDOV, M. et al. The effects of XanthigenTM In the weight management of obese premenopausal women with non-alcoholic fatty liver disease and normal liver fat. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 12, p. 72–81, 2010.

ALCANTARA LLAGUNO, S. R.; PARADA, L. F. Cell of origin of glioma: biological and clinical implications. **British Journal of Cancer**, v. 115, n. 12, p. 1445–1450, 2016.

ARITA, T. et al. Tumor exosome-mediated promotion of adhesion to mesothelial cells in gastric cancer cells. **Oncotarget**, v. 7, n. 35, p. 56855–56863, 2016.

ASAI, A. et al. Biotransformation of fucoxanthinol into amarouciaxanthin A in mice and HepG2 cells: formation and cytotoxicity of fucoxanthin metabolites. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 32, n. 2, p. 205–211, 2004.

AWAN, M. et al. Extra-CNS metastasis from glioblastoma: a rare clinical entity. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 15, n. 5, p. 545–552, 2015.

BAAN, R. et al. Carcinogenicity of radiofrequency electromagnetic fields. **The Lancet Oncology**, v. 12, n. 7, p. 624–626, 2011.

BAO, S. et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. **Nature**, v. 444, n. 7120, p. 756–760, 2006.

BAUER, C. M. Prospecção de carotenoides em diatomáceas (Bacillariophyceae): Ênfase em fucoxantina. **Dissertação (Mestrado) - Programa de Biotecnologia e Biociências**, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

BEAUCHESNE, P. Extra-Neural Metastases of Malignant Gliomas: Myth or Reality? **Cancers**, v. 3, n. 1, p. 461–477, 2011.

BEPPU, F. et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of mutagenicity of fucoxanthin (FX) and its metabolite fucoxanthinol (FXOH). **The Journal of toxicological sciences**, v. 34, n. 6, p. 693–698, 2009.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Journal for Clinicians**, v. 00, n. 00, p. 1–31, 2018.

CHEN, C. et al. Allergy and risk of glioma: a meta-analysis. **European Journal of Neurology**, v. 18, n. 3, p. 387–395, 2011.

CHEN, J. et al. A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. **Nature**, v. 488, n. 7412, p. 522–526, 2012.

CHUNG, T. W. et al. Marine algal fucoxanthin inhibits the metastatic potential of cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 439, n. 4, p. 580–585, 2013.

CUDDAPAH, V. A. et al. A neurocentric perspective on glioma invasion. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 15, n. 7, p. 455–465, 2014.

CWIKLOWSKA, K. et al. Viability of glioblastoma stem cells is effectively reduced by diisothiocyanate-derived mercapturic acids. **Oncology Letters**, v. 16, p. 6181–6187, 2018.

DAS, S. K.; HASHIMOTO, T.; KANAZAWA, K. Growth inhibition of human hepatic carcinoma HepG2 cells by fucoxanthin is associated with down-regulation of cyclin D. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1780, n. 4, p. 743–749, 2008.

DE, A. et al. Smart niosomes of temozolomide for enhancement of brain targeting. **Nanobiomedicine**, v. 5, p. 1–11, 2018.

DEMBITSKY, V. M.; MAOKA, T. Allenic and cumulenenic lipids. **Progress in Lipid Research**, v. 46, n. 6, p. 328–375, 2007.

DÍAZ DE LA LOZA, M. C. et al. Laminin Levels Regulate Tissue Migration and Anterior-Posterior Polarity during Egg Morphogenesis in *Drosophila*. **Cell Reports**, v. 20, n. 1, p. 211–223, 2017.

FILARDO, E. J. et al. Requirement of the NPXY Motif in the Integrin $\beta 3$ Subunit Cytoplasmic Tail for Melanoma Cell Migration *In Vitro* and *In Vivo*. **Journal of Cell Biology**, v. 130, n. 2, p. 441–450, 1995.

FRANTZ, C.; STEWART, K. M.; WEAVER, V. M. The extracellular matrix at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 123, n. 24, p. 4195–4200, 2010.

FUKUSHIMA, Y. et al. Integrin $\alpha 3 \beta 1$ -mediated interaction with laminin-5 stimulates adhesion, migration and invasion of malignant glioma cells. **International Journal of Cancer**, v. 76, n. 1, p. 63–72, 1998.

GAKIDOU, E. et al. Global, regional, and national comparative risk assessment of 84 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **The Lancet**, v. 390, n. 10100, p. 1345–1422, 2017.

GARZON-MUVDI, T. et al. Regulation of brain tumor dispersal by NKCC1 through a novel role in focal adhesion regulation. **PLoS Biology**, v. 10, n. 5, p. e1001320, 2012.

GIANNELLI, G.; ANTONACI, S. Biological and clinical relevance of Laminin-5 in cancer. **Clinical and Experimental Metastasis**, v. 18, n. 6, p. 439–443, 2000.

GRITSENKO, P. G.; FRIEDL, P. Adaptive adhesion systems mediate glioma cell invasion in complex environments. **Journal of Cell Science**, v. 131, n. 15, 2018.

GROOTHUIS, D. R. The blood-brain and blood-tumor barriers : A review of strategies for increasing drug delivery. **Neuro-Oncology**, v. 2, n. 1, p. 45–59, 2000.

GU, J. et al. Laminin-10/11 and Fibronectin Differentially Regulate Integrin-dependent Rho and Rac Activation via p130^{Cas}-CrkII-DOCK180 Pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 29, p. 27090–27097, 2001.

GUPTA, T. et al. Can irradiation of potential cancer stem-cell niche in the subventricular zone influence survival in patients with newly diagnosed glioblastoma? **Journal of Neuro-Oncology**, v. 109, n. 1, p. 195–203, 2012.

HEDRICK, E. et al. NR4A1 Antagonists Inhibit β 1-Integrin-Dependent Breast Cancer Cell Migration. **Molecular and Cellular Biology**, v. 36, n. 9, p. 1383–1394, 2016.

HOHENESTER, E.; YURCHENCO, P. D. Laminins in basement membrane assembly. **Cell Adhesion & Migration**, v. 7, n. 1, p. 56–63, 2013.

HOSOKAWA, M. et al. Apoptosis-Inducing Effect of Fucoxanthin on Human Leukemia Cell Line HL-60. **Food Science and Technology Research**, v. 5, n. 3, p. 243–246, 1999.

HOSOKAWA, M. et al. Fucoxanthin induces apoptosis and enhances the antiproliferative effect of the PPAR γ ligand, troglitazone, on colon cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1675, n. 1–3, p. 113–119, 2004.

HU, L. et al. Neuroprotective role of fucoxanthin against cerebral ischemic/reperfusion injury through activation of Nrf2/HO-1 signaling. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 106, p. 1484–1489, 2018.

HU, X. et al. Combination of fucoxanthin and conjugated linoleic acid attenuates body weight gain and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced obese rats. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 519, p. 59–65, 2012.

HUSE, J. T.; HOLLAND, E. C. Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 5, p. 319–331, 2010.

INSTITUTO NACIONAL DE CâNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA.
Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: [s.n.].

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Cancer Incidence in Five Continents.** 10. ed. Lyon: International Association of Cancer Registries, 2014.

JARVELAINEN, H. et al. Extracellular Matrix Molecules: Potential Targets in Pharmacotherapy. **Pharmacological Reviews**, v. 61, n. 2, p. 198–223, 2009.

JEMAL, A. et al. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2014, Featuring Survival. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 109, n. 9, p. 1–22, 2017.

JIANG, Y.; UHRBOM, L. On the origin of glioma. **Upsala Journal of Medical Sciences**, v. 117, n. 2, p. 113–121, 2012.

JONES, J. L.; WALKER, R. A. Integrins: a role as cell signalling molecules. **Journal of Clinical Pathology: Molecular Pathology**, v. 52, n. 4, p. 208–213, 1999.

JONES, T. S.; HOLLAND, E. C. Molecular Pathogenesis of Malignant Glial Tumors. **Toxicologic Pathology**, v. 39, n. 1, p. 158–166, 2011.

JOURQUIN, J. et al. Laminins and Cancer Progression. In: ZENT, R.; POZZI, A. (Eds.). **. Cell-Extracellular Matrix Interactions in Cancer.** New York: Springer, 2010. p. 1–314.

JUSTUS, C. R. et al. *In vitro* Cell Migration and Invasion Assays. **Journal of Visualized Experiments**, n. 88, p. 1–8, 2014.

KAWATAKI, T. et al. Laminin isoforms and their integrin receptors in glioma cell migration and invasiveness: Evidence for a role of $\alpha 5$ -laminin(s) and $\alpha 3\beta 1$ integrin. **Experimental Cell Research**, v. 313, n. 18, p. 3819–3831, 2007.

KIM, S. H.; TURNBULL, J.; GUIMOND, S. Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. **Journal of Endocrinology**, v. 209, n. 2, p. 139–151, 2011.

KONISHI, I. et al. Halocynthiaxanthin and fucoxanthinol isolated from *Halocynthia roretzi* induce apoptosis in human leukemia, breast and colon cancer cells. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 142, n. 1–2, p. 53–59, 2006.

KURATSU, J.; TAKESHIMA, H.; USHIO, Y. Trends in the incidence of primary intracranial tumors in Kumamoto, Japan. **International Journal of Clinical Oncology**, v. 6, p. 183–191, 2011.

LAKSHMANAN, I. et al. MUC5AC interactions with integrin $\beta 4$ enhances the migration of lung cancer cells through FAK signaling. **Oncogene**, v. 35, n. 31, p. 4112–4121, 2016.

LI, Y. M. et al. The influence of maximum safe resection of T1 contrast-enhancing tumor and T2 FLAIR abnormality on survival in 1229 glioblastoma patients. **Journal of neurosurgery**, v. 124, n. 4, p. 977–988, 2016.

LIU, Y. et al. Fucoxanthin Activates Apoptosis via Inhibition of PI3K/Akt/mTOR Pathway and Suppresses Invasion and Migration by Restriction of p38-MMP-2/9 Pathway in Human Glioblastoma Cells. **Neurochemical Research**, v. 41, n. 10, p. 2728–2751, 2016.

LODISH, H. et al. **Biologia celular e molecular**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

LOPES-COSTA, E. et al. Anticancer effects of seaweed compounds fucoxanthin and phloroglucinol, alone and in combination with 5-fluorouracil in colon cells. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues**, v. 80, n. 13–15, p. 776–787, 2017.

LOPES, F. G. Estudo dos efeitos antitumorais do carotenoide fucoxantina em células de glioblastoma humano. **Dissertação (Mestrado) - Programa de Biologia Celular e do Desenvolvimento**, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018.

LOUIS, D. N. et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta Neuropathologica**, v. 114, n. 2, p. 97–109, 2007.

LOUIS, D. N. et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Acta Neuropathologica**, v. 131, n. 6, p. 803–820, 2016.

MARTIN, L. J. Fucoxanthin and Its Metabolite Fucoxanthinol in Cancer Prevention and Treatment. **Marine Drugs**, v. 13, n. 8, p. 4784–4798, 2015.

MEI, C. et al. Antitumor effects of laminaria extract fucoxanthin on lung cancer. **Marine Drugs**, v. 15, n. 2, p. 1–12, 2017.

MIKAMI, K.; HOSOKAWA, M. Biosynthetic Pathway and Health Benefits of Fucoxanthin, an Algae-Specific Xanthophyll in Brown Seaweeds. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 7, p. 13763–13781, 2013.

MIKAMI, N. et al. Reduction of HbA1c levels by fucoxanthin-enriched akamoku oil possibly involves the thrifty allele of uncoupling protein 1 (UCP1): A randomised controlled trial in normal-weight and obese Japanese adults. **Journal of Nutritional Science**, v. 6, n. 5, p. 1–9, 2017.

MORRISSEY, M. A.; SHERWOOD, D. R. An active role for basement membrane assembly and modification in tissue sculpting. **Journal of Cell Science**, v. 128, n. 9, p. 1661–1668, 2015.

MUKHERJEE, S. **O imperador de todos os males: uma biografia do câncer**. 1. ed. São Paulo: Companhia das Letras, 2012.

MÜLLER, C. et al. Hematogenous dissemination of glioblastoma multiforme. **Science Translational Medicine**, v. 6, n. 247, p. 1–9, 2014.

NOCH, E.; KHALILI, K. Molecular mechanisms of necrosis in glioblastoma: The role of glutamate excitotoxicity. **Cancer Biology and Therapy**, v. 8, n. 19, p. 1791–1797, 2009.

OHGAKI, H.; KLEIHUES, P. Epidemiology and etiology of gliomas. **Acta Neuropathologica**, v. 109, n. 1, p. 93–108, 2005.

OHGAKI, H.; KLEIHUES, P. The definition of primary and secondary glioblastoma. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 4, p. 764–772, 2013.

OSTROM, Q. T. et al. CBTRUS Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010–2014. **Neuro-Oncology**, v. 19, n. suppl_5, p. v1–v88, 2017.

PAW, I. et al. Mechanisms regulating glioma invasion. **Cancer Letters**, v. 362, n. 1, p. 1–7, jun. 2015.

PENG, J. et al. Fucoxanthin, a Marine Carotenoid Present in Brown Seaweeds and Diatoms: Metabolism and Bioactivities Relevant to Human Health. **Marine Drugs**, v. 9, n. 10, p. 1806–1828, 2011.

PLOW, E. F. et al. Ligand binding to integrins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 29, p. 21785–21788, 2000.

POLLARD, P. J.; RATCLIFFE, P. J. Cancer: Puzzling Patterns of Predisposition. **Science**, v. 324, n. 5924, p. 192–194, 2009.

RAMOVŠ, V.; TE MOLDER, L.; SONNENBERG, A. The opposing roles of laminin-binding integrins in cancer. **Matrix Biology**, v. 57–58, p. 213–243, 2017.

ROKKAKU, T. et al. Anticancer effects of marine carotenoids, fucoxanthin and its deacetylated product, fucoxanthinol, on osteosarcoma. **International Journal of Oncology**, v. 43, n. 4, p. 1176–1186, 2013.

SACHINDRA, N. M. et al. Radical scavenging and singlet oxygen quenching activity of marine carotenoid fucoxanthin and its metabolites. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 8516–8522, 2007.

SALAZAR, O. M. et al. High dose radiation therapy in the treatment of malignant gliomas: final report. **International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics**, v. 5, n. 10, p. 1733–1740, 1979.

SATOMI, Y. Antitumor and Cancer-preventative Function of Fucoxanthin: A Marine Carotenoid. **Anticancer Research**, v. 37, p. 1557–1562, 2017.

SCHMIDT, S.; FRIEDL, P. Interstitial cell migration: integrin-dependent and alternative adhesion mechanisms. **Cell and Tissue Research**, v. 339, p. 83–92, 2010.

SCHULTZ, S. et al. Fine needle aspiration diagnosis of extracranial glioblastoma multiforme: Case report and review of the literature. **CytoJournal**, v. 2, n. 19, p. 1–6, 2005.

SHO, H. History and characteristics of Okinawan longevity food. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 10, n. 2, p. 159–164, 2001.

STEPANENKO, A. A.; DMITRENKO, V. V. Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. **Gene**, v. 574, n. 2, p. 193–203, 2015.

STEWART, B. W.; WILD, C. P. World cancer report 2014. **World Health Organization**, p. 1–2, 2014.

STUPP, R.; VAN DEN BENT, M. J.; HEGI, M. E. Optimal role of temozolomide in the treatment of malignant gliomas. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v. 5, n. 3, p. 198–206, maio 2005.

TANAKA, T.; SHNIMIZU, M.; MORIWAKI, H. Cancer chemoprevention by carotenoids. **Molecules**, v. 17, n. 3, p. 3202–3242, 2012.

TAVELLA, S. et al. Regulated expression of fibronectin, laminin and related integrin receptors during the early chondrocyte differentiation. **Journal of Cell Science**, v. 110, p. 2261–2270, 1997.

TREPAT, X.; CHEN, Z.; JACOBSON, K. Cell Migration. **Comprehensive Physiology**, v. 2, n. October, p. 2369–2392, 2012.

VILLENEUVE, P. J. et al. Brain cancer and occupational exposure to magnetic fields among men: results from a Canadian population-based case-control study. **International Journal of Epidemiology**, v. 31, n. 1, p. 210–217, 2002.

WANG, L. et al. Fucoxanthin induces growth arrest and apoptosis in human bladder cancer T24 cells by up-regulation of p21 and down-regulation of mortalin. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 46, n. 10, p. 877–884, 2014.

WATKINS, S.; SONTHEIMER, H. Hydrodynamic Cellular Volume Changes Enable Glioma Cell Invasion. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 47, p. 17250–17259, 2011.

WEINBERG, R. A. **A biologia do câncer**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

WEN, P.; KESARI, S. Malignant Gliomas in Adults. **New England Journal of Medicine**, v. 359, n. 5, p. 492–507, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer**. Disponível em: <<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Health Estimates 2016: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2016**. Geneva, 2018b. Disponível em: <http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/>

XIANG, S. et al. Fucoxanthin Inhibits β -Amyloid Assembly and Attenuates β -Amyloid Oligomer-Induced Cognitive Impairments. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 20, p. 4092–4102, 2017.

YE, Z.-C.; ROTHSTEIN, J. D.; SONTHEIMER, H. Compromised Glutamate Transport in Human Glioma Cells: Reduction-Mislocalization of Sodium-Dependent Glutamate Transporters and Enhanced Activity of Cystine-Glutamate Exchange. **The Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 24, p. 10767–10777, 1999.

ZHANG, L. et al. Fucoxanthin provides neuroprotection in models of traumatic brain injury via the Nrf2-ARE and Nrf2-autophagy pathways. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1–15, 2017.

ZHANG, N. et al. Molecular pathological expression in malignant gliomas resected by fluorescein sodium-guiding under the YELLOW 560 nm surgical microscope filter. **World Journal of Surgical Oncology**, v. 16, n. 195, p. 1–10, 2018.

ZHANG, Y. et al. Comparative evaluation of the radical-scavenging activities of fucoxanthin and its stereoisomers. **Molecules**, v. 19, p. 2100–2113, 2014.

ZHOU, H.; KRAMER, R. H. Integrin Engagement Differentially Modulates Epithelial Cell Motility by RhoA/ROCK and PAK1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 11, p. 10624–10635, 2005.

ZHU, Y. et al. Effects of fucoxanthin on autophagy and apoptosis in SGC-7901 cells and the mechanism. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 119, n. 9, p. 7274–7284, 2018.

ANEXOS

Parecer do CEP SH

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC

**PROJETO DE PESQUISA**

Título: CARACTERIZAÇÃO E ESTABELECIMENTO DE CULTURAS CELULARES PRIMÁRIAS A PARTIR DE GLIOMAS PROVENIENTES DE PACIENTES SUBMETIDOS À CIRURGIA DE RESSECÇÃO NO HOSPITAL GOVERNADOR CELSO RAMOS, FLORIANÓPOLIS, SC

Área Temática:

Área 3. Fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos novos (fases I, II e III) ou não registrados no país (ainda que fase IV), ou quando a pesquisa for referente a seu uso com modalidades, indicações, doses ou vias de administração diferentes daquelas estabelecidas, incluindo seu emprego em combinações.

Versão: 1

CAAE: 04087112.9.0000.0121

Pesquisador: Cláudia Beatriz Nedel Mendes de Aguiar

Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA (Hospital Universitário HU- UFSC)

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 108.286

Data da Relatoria: 24/09/2012

Apresentação do Projeto:

O estudo de Aguiar pretende estudar culturas de células de gliomas ressecados de pacientes do Hospital Celso Ramos, Florianópolis.

Objetivo da Pesquisa:

Estabelecer linhagens tumorais primárias a partir de gliomas humanos provenientes de pacientes submetidos à ressecção de tumores no Hospital Celso Ramos, Florianópolis, SC, estudando nestas linhagens os efeitos do tratamento com temozolamida e carmustina na modulação do aminoácido excitatório glutamato e o perfil de células tronco presentes.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos suplantam os benefícios.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Contribuirá sobre o conhecimento generalizável sobre o tema.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE adequado, anuência do HGCR.

Recomendações:

Não se aplica

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pela aprovação

Endereço: Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima

Bairro: Trindade

CEP: 88.040-900

UF: SC

Município: FLORIANÓPOLIS

Telefone: (48)3721-9208

Fax: (48)3721-9898

E-mail: cep@reitoria.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado

FLORIANOPOLIS, 26 de Setembro de 2012

Assinado por:
Washington Portela de Souza

Endereço: Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima
Bairro: Trindade CEP: 88.040-900
UF: SC Município: FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-9206 Fax: (48)3721-9696 E-mail: cep@reitoria.ufsc.br